

Title	線虫Caenorhabditis elegansにおける脱塩基部位修復の機能解析( Abstract_要旨 )
Author(s)	加藤, 悠一
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2015-05-25
URL	<a href="http://dx.doi.org/10.14989/doctor.k19165">http://dx.doi.org/10.14989/doctor.k19165</a>
Right	学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2016-03-01に公開
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	none

( 続紙 1 )

京都大学	博 士（理 学）	氏名	加藤 悠一
論文題目	線虫 <i>Caenorhabditis elegans</i> における脱塩基部位修復の機能解析		
<p>絶えず生じるDNA損傷を修復することはすべての生物にとって必須である。脱塩基部位は最も多く発生するDNA損傷のひとつであり、複製や転写を阻害する。APエンドヌクレアーゼは脱塩基部位の修復を促進する重要な酵素であり、細胞の機能低下や細胞死、突然変異を防ぐ役割を担っている。本研究の目的は線虫<i>Caenorhabditis elegans</i>を用いて、多細胞生物における脱塩基部位修復の役割を明らかにすることである。線虫におけるAPエンドヌクレアーゼであるEXO-3およびAPN-1に注目し、その機能解析を行った。線虫におけるAPエンドヌクレアーゼの役割を類推するため、各遺伝子の発現を<i>in situ</i>ハイブリダイゼーション、GFPレポーターアッセイなどによって解析した。線虫の生殖巣における脱塩基部位を定量するため、生殖巣を持たない変異株からDNAを抽出して、アルデヒド反応プローブによって検出し、正常な線虫での値と比較した。<i>exo-3</i>および<i>apn-1</i>遺伝子に欠損のある線虫を入手し、各遺伝子産物由来のAPエンドヌクレアーゼ活性が失われていることを<i>in vitro</i>において確認した。他変異体との掛け合わせにより様々な多重欠損株を作製し、その表現型解析を行った。<i>exo-3</i>および<i>apn-1</i>遺伝子はいずれも生殖巣において多く発現しており、遺伝子産物は核に局在した。これらの結果は線虫の生殖において、APエンドヌクレアーゼが重要な役割を担っていることを示唆している。さらに、生殖巣における脱塩基部位を定量するため、生殖巣を形成することができない<i>glp-1</i>変異株における脱塩基部位量を測定した。生殖巣がない線虫ではDNAあたりの脱塩基部位量の増加が見られた。この結果は、生殖巣における脱塩基部位量は他組織と比べて少ないことを示している。すなわち、生殖巣では他の組織に比べてAPエンドヌクレアーゼ活性が高いことが見いだされた。<i>exo-3</i>および<i>apn-1</i>遺伝子の欠損株を用いて生殖関連の表現型を観察したところ、<i>exo-3</i>欠損株においては抱卵数と総卵数に有意な低下が見られた。この結果はEXO-3が線虫の生殖に寄与していることを示している。産卵開始時期が遅延していたことから、生殖巣の成熟にも関係している可能性が考えられる。種々の欠損株を用いて寿命の測定を行ったところ、<i>exo-3</i>欠損株において寿命の有意な低下が見られた。この寿命低下はチミジル酸合成酵素の阻害剤である5-フルオロ-2'-デオキシウリジン処理やdUTP分解酵素遺伝子である<i>dut-1</i>のノックダウンによって回復した。同様に胚性致死を引き起こす<i>pos-1</i>遺伝子のノックダウンおよび<i>glp-1</i>遺伝子の変異による生殖巣形成阻害によっても<i>exo-3</i>欠損株の寿命は回復した。これらの結果は<i>exo-3</i>欠損株の寿命低下が生殖の異常を介してもたらされることを示している。<i>apn-1</i>遺伝子の欠損からは何の異常も見られなかった。通常状態におけるAPエンドヌクレアーゼ活性はEXO-3に由来するものが主体であり、ストレス条件下においてはAPN-1が機能する可能性が考えられる。APエンドヌクレアーゼは生殖巣において多く発現しており、生殖巣における脱塩基部位量を低く抑えることで生殖に寄与している。APエンドヌクレアーゼの遺伝子が欠損すると生殖関連の異常が生じるほか、異常な生殖を介して寿命の低下が引き起こされる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

絶えず生じるDNA損傷を修復することはすべての生物にとって必須である。塩基の自然な脱離によって発生する脱塩基部位は通常環境において最も多く発生するDNA損傷であり、転写や複製を阻害することで細胞の機能低下や細胞死、突然変異を誘発する。これまでの脱塩基部位の修復に関わる研究は*in vitro*における生化学的実験や大腸菌および培養細胞を用いた実験が主であった。一方、多細胞生物に特徴的な、複数種類の細胞・組織が複雑に関係し合う高次の生命現象において脱塩基部位修復がどのように関与しているかは十分解明されていなかった。本論文は、単純な体構造をもつ線虫*Caenorhabditis elegans*を利用し、多細胞生物に特有の生命現象における脱塩基部位修復の役割の解明を目指したものである。その結果、生殖と寿命に対する脱塩基部位修復の寄与が明らかになった。

種の状態を一定に保つ上で、生殖細胞系列に生じるDNA損傷を修復し突然変異の発生を抑制することはきわめて重要である。しかし、生殖に対する脱塩基部位修復の寄与を直接的に示す証拠はこれまで得られていなかった。線虫は基本的に雌雄同体、自家受精で生殖を行うため、遺伝的に非常に均一である。また、幼虫期においてのみ生産される精子の数が限られていることから、株ごとの抱卵数(生涯に自家受精で生む受精卵の総数)は一定である。異性との交配を行う他の多細胞生物種と比べて、抱卵数という指標によって生殖能力の信頼性の高い評価を行うことができるのは線虫の大きな利点である。線虫のEXO-3およびAPN-1は脱塩基部位修復において重要な役割を担うAPエンドヌクレアーゼである。本論文は、これらのAPエンドヌクレアーゼが線虫の生殖巣において特に多く発現しており、これに対応して、生殖巣における脱塩基部位量が他の組織と比較して少ないことを見出した。脱塩基部位の定量には多量のDNAを必要とするため、線虫のように小さな生物種では組織ごとの解析を行うのはきわめて困難である。本論文は生殖巣を失った変異株の値と比較することで組織ごとの脱塩基部位の定量に成功しており、非常に独創的であるといえる。さらに本論文では、*exo-3*遺伝子の欠損株では抱卵数が低下するなど、この遺伝子の欠損が生殖における異常を引き起こすことも発見した。これらの結果は生殖に対する脱塩基部位修復の寄与を強く示唆している。生殖に対するDNA修復の寄与が実験的に示されたことはきわめて重要であり、本論文はこの分野の今後の研究に対して多大な影響を及ぼすと考えられる。

多細胞生物の寿命もまた、多くの要因によって決定される複雑な生命現象である。本論文では *exo-3* 遺伝子の欠損が寿命の短縮を引き起こすことを見出した。この短寿命化は、5-フルオロ 2'-デオキシウリジン処理や *glp-1* 遺伝子の変異による生殖巣の喪失、さらに *dut-1* 遺伝子や *pos-1* 遺伝子のノックダウンといった生殖の阻害をもたらす処理によって回復した。この結果は *exo-3* 遺伝子の欠損による寿命の短縮が、生殖における異常を介して引き起こされることを示している。線虫において、特定の DNA 修復の欠損が寿命の短縮を引き起こすことはこれまでの研究においても示されていたが、その原因が生殖の異常にあることを見出したのは本論文が初めてである。今後、多細胞生物における DNA 修復の意義を解明する上で、生殖の異常が寿命にも影響することを明らかにした本論文はきわめて重要なものである。

よって本論文は博士(理学)の学位論文として価値のあるものと認める。また、平成27年2月16日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日：2015年 月 日以降